

-Lys-H, -Arg-H, -Phe-H or Leu-M; (ii) R1a(G)n- = benzyloxycarbonyl, R4a = OH and XaR3a = -NCH(CHO)(CHOH)3CH2OH (sic); and (iii) R1a-(G)n = benzoyl, R4a = H, and -Xa-R3a = -Arg-H or -Arg(COOCH2Ph)-H; R = 2-fluorophenyl; R' = 2-(ethylaminocarbonyl)-phenyl; Q = 4-nitrophenyl; and M = 2-oxo-piperazin-4-yl.

USE - The compounds are used in the treatment of bone disorders e.g. osteoporosis, Paget's disease and acute neoplastic hypercalcaemia (claimed). They are administered perorally in a daily dosage of 1-200 mg/kg or by any other method in a daily dosage of 0.1-100 mg/kg.

ADVANTAGE - (I') are selective inhibitors of cathepsin K, with little inhibitory effect on cathepsin L and thus side effects are reduced.

Dwg.0/0

Derwent Class: B03

International Patent Class (Main): A61K-031/40

International Patent Class (Additional): A61K-031/415; A61K-031/42; A61K-031/425; A61K-031/445; A61K-031/495; A61K-031/535; A61K-035/05; A61K-035/06; A61K-035/55; C07D-207/16; C07D-405/12; C07D-413/12; C07D-417/12; C07K-005/078; C07K-005/083

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

□ 2.

2/34/2 (Item 2 from file: 345)

14089839

Basic Patent (No,Kind,Date): WO 9801133 A1 19980115

PATENT FAMILY:

AUSTRALIA (AU)

Patent (No,Kind,Date): AU 9733596 A1 19980202

BONE RESORPTION INHIBITORS (English)

Patent Assignee: YAMANOUCHI PHARMA CO LTD

Author (Inventor): AIBE KAZUHIKO; TAKEBAYASHI YUKIHIRO; ISHII YASUTAKA; NOSHIRO OSAMU; NODA ICHIO; IGARASHI SUSUMU

Priority (No,Kind,Date): JP 96177955 A 19960708; WO 97JP2357 W 19970708

Applic (No,Kind,Date): AU 9733596 A 19970708

IPC: * A61K-031/40; A61K-031/415; A61K-031/42; A61K-031/425; A61K-031/445; A61K-031/495; A61K-031/535; A61K-035/06; A61K-035/55; C07D-207/16; C07D-405/12; C07D-413/12; C07D-417/12; C07K-005/078; C07K-005/083

CA Abstract No: * 128(12)136515R

Derwent WPI Acc No: * C 98-130273

Language of Document: English

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION, PCT (WO)

Patent (No,Kind,Date): WO 9801133 A1 19980115

BONE RESORPTION INHIBITORS (English)

Patent Assignee: YAMANOUCHI PHARMA CO LTD (JP); AIBE KAZUHIKO (JP); TAKEBAYASHI YUKIHIRO (JP); ISHII YASUTAKA (JP); NOSHIRO OSAMU (JP); NODA ICHIO (JP); IGARASHI SUSUMU (JP)

Author (Inventor): AIBE KAZUHIKO (JP); TAKEBAYASHI YUKIHIRO (JP); ISHII YASUTAKA (JP); NOSHIRO OSAMU (JP); NODA ICHIO (JP); IGARASHI SUSUMU (JP)

Priority (No,Kind,Date): JP 96177955 A 19960708

Applic (No,Kind,Date): WO 97JP2357 A 19970708

Designated States: (National) AL; AM; AU; AZ; BA; BB; BG; BR; BY; CA; CN; CU; CZ; EE; GE; GH; HU; IL; IS; JP; KE; KG; KR; KZ; LC; LK; LR; LS; LT; LV; MD; MG; MK; MN; MW; MX; NO; NZ; PL; RO; RU; SD; SG; SI; SK; TJ; TM; TR; TT; UA; UG; US; UZ; VN; YU; AM; AZ; BY; KG; KZ; MD; RU; TJ; TM (Regional) GH; KE; LS; MW; SD; SZ; UG; ZW; AT; BE; CH; DE; DK; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; LU; MC; NL; PT; SE; BF; BJ; CF; CG; CI; CM; GA; GN; ML; MR; NE

Filing Details: WO 100000 with international search report
IPC: * A61K-031/40; A61K-031/415; A61K-031/42; A61K-031/425;
A61K-031/445; A61K-031/495; A61K-031/535; A61K-031/505; A61K-035/06;
A61K-035/55; C07D-207/16; C07D-405/12; C07D-413/12; C07D-417/12;
C07K-005/078; C07K-005/083
CA Abstract No: ; 128(12)136515R
Derwent WPI Acc No: ; C 98-130273
Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2003 EPO. All rights reserved.

select
all none

Records 1-2 of 2 In long Format

Output ?

Format: Long Output as: Browser display / send

Modify ?

refine search

back to picklist

©1997-2003 The Dialog Corporation - Version 2.3



Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, JAPIO -Patent Abstracts of Japan, Derwent World Patents Index

Records for: PN=JP 5294826

save as alert...

save strategy only...

Output

Format:

Long

Output as:

Browser

display / send

Modify

refine search

back to picklist

select
all none

Records 1-3 of 3 In long Format

1. 6/34/1 (Item 1 from file: 351)

009699007

-WPI ACC-No: 1993-392560/ 199349

Sustained-release microcapsules contg. peptide - in
biodegradable aliphatic polyester, useful for treatment of osteoporosis

Patent Assignee: TAKEDA CHEM IND LTD (TAKE)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	week
JP 5294826	A	19931109	JP 9297961	A	19920417	199349 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9297961 A 19920417

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 5294826	A		8	A61K-009/52	

Abstract (Basic): JP 5294826 A

Sustained-release microcapsules comprises oligopeptides or their salts with bone absorption inhibitory activity in biodegradable aliphatic polyesters.

USE/ADVANTAGE - The microcapsules are effective for treatment of osteoporosis and their effects are long-lasting.

In an example, osteostatin 40 mg dissolved in 0.05 ml of distilled water was mixed for 60 seconds with 1 g of polylactate and 1 g of copolymer of glycolic acid and 2-hydroxybutyric acid in 2.5 ml of dichloromethane to give W/O emulsion. The emulsion was cooled to 18 deg. C and infused to 0.1%. PVA aq. soln. of 500 ml using a mixer to give W/O/W type emulsion. The inside W/O emulsion was solidified by evaporating dichloromethane from W/O/W emulsion and collected using a centrifugal equipment. The obtd. emulsion was scattered in distilled water and centrifuged. D-mannitol of 0.15 g was added to the collected microcapsules and freeze-dried.

Dwg. 0/0

Derwent Class: B04; B07

International Patent Class (Main): A61K-009/52

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-037/24;

A61K-037/30; A61K-047/34

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

2. 6/34/2 (Item 2 from file: 347)

04303126 PEPTIDE-CONTAINING SUSTAINED-RELEASE MICROCAPSULE

Pub. No.: 05-294826 [JP 5294826 A]

Published: November 09, 1993 (19931109)

Inventor: YAMADA MINORU

KAMEI SHIGERU

OGAWA TAIRYO

Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD [000293] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 04-097961 [JP 9297961]

Filed: April 17, 1992 (19920417)

International Class: [5] A61K-009/52; A61K-037/02; A61K-037/24; A61K-037/30; A61K-047/34

JAPIO Class: 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)

JAPIO Keyword: R013 (MICROCAPSULES)

Journal: Section: C, Section No. 1166, Vol. 18, No. 93, Pg. 125, February 16, 1994 (19940216)

ABSTRACT

PURPOSE: To provide the subject sustained-release microcapsule containing an oligopeptide exhibiting a bone resorption inhibitory effect and useful for improving osteoporosis.

CONSTITUTION: This sustained-release microcapsule is composed of an oligopeptide exhibiting a bone resorption inhibitory effect or its salt encapsulated in a biodegradative polyester. Since the oligopeptide exhibiting a bone resorption inhibitory effect can be released into the living body over a long period this sustained-release microcapsule can effectively improve osteoporosis.

JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2003 JPO & JAPIO. All rights reserved.

☐ 3. 6/34/3 (Item 3 from file: 345)

11478743

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 5294826 A2 931109

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 5294826 A2 931109

PEPTIDE-CONTAINING SUSTAINED-RELEASE MICROCAPSULE (English)

Patent Assignee: TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD

Author (Inventor): YAMADA MINORU; KAMEI SHIGERU; OGAWA TAIRYO
Priority (No,Kind,Date): JP 9297961 A 920417
Applic (No,Kind,Date): JP 9297961 A 920417
IPC: * A61K-009/52; A61K-037/02; A61K-037/24; A61K-037/30; A61K-047/34
CA Abstract No: ; 120(12)144197P
Derwent WPI Acc No: ; C 93-392560
JAPIO Reference No: ; 180093C000125
Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2003 EPO. All rights reserved.

select
talk none

Records 1-3 of 3 In long Format

Output ?

Format:

Long

Output as:

Browser

display / send

Modify ?

refine search

back to picklist

©1997-2003 The Dialog Corporation - Version 2.3

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-294826

(43)公開日 平成5年(1993)11月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 9/52	G	7329-4C		
	H	7329-4C		
37/02	A B J	8314-4C		
37/24		8314-4C		
37/30		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-97961

(22)出願日 平成4年(1992)4月17日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 山田 稔

兵庫県川西市湯山台1丁目1番8号

(72)発明者 亀井 茂

兵庫県宝塚市すみれが丘1丁目7番1-509号

(72)発明者 小川 泰亮

京都府乙訓郡大山崎町字大山崎小字谷田77番地の42

(74)代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54)【発明の名称】 ペプチド含有徐放性マイクロカプセル

(57)【要約】

【目的】骨粗鬆症治療に有用な、骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドを含有する徐放性マイクロカプセルを提供する。

【構成】骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドまたはその塩を生体内分解性ポリエステル中に含有させてなる徐放性マイクロカプセル。

【効果】本発明の徐放性マイクロカプセルは骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドを長期にわたって生体内に放出し、骨粗鬆症治療に有効である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドまたはその塩を生体内分解性脂肪族ポリエステル中に含有させてなる徐放性マイクロカプセル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、骨粗鬆症治療に有用な徐放性マイクロカプセルに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、高齢人口の増大とともに成人病患者数はますます増加し社会問題にもなっている。成人病の中でも、最も厄介なのが骨粗鬆症である。骨粗鬆症の治療薬としては、カルシトニン、活性型ビタミンD₃、副甲状腺ホルモン（PTH）、ビスフォスフォネート類がよく知られている。最近、PTH関連蛋白（PTHrP）中の骨吸収阻害活性を持つ活性フラグメントであるオステオスタチン（Thr-Arg-Ser-Ala-Trp）およびその関連化合物が注目されている。〔エンドクリノロジー（Endocrinology）、第129巻、3424～3426ページ、1991年〕

【0003】一方、マイクロカプセル等の徐放性製剤の基剤として、生体内分解性高分子重合物をを用いることが知られてる。このような生体内分解性高分子重合物として、例えば、特開昭61-28521号公報には、乳酸および／またはグリコール酸を触媒の存在下または不存在下で重縮合させることにより、これらの重合物もしくは共重合物が得られることが記載されている。特公平1-5708号公報には、このような生体内分解性高分子重合物をを用いた徐放性マイクロカプセルの製造法が開示されている。また、特開昭62-54760号公報には、生体内分解性高分子重合物を溶液を水洗して水易溶性低分子化合物を除去する事によりマイクロカプセルからの薬物の初期放出を改善出来ることが記載されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】前述の骨吸収阻害活性薬物は、骨粗鬆症治療を目的として、現時点では連日または、週に数回注射による投与が行われている。高齢でしかも慢性の経過をとって発症する骨粗鬆症患者には、頻回の注射は筋肉硬化症等臨床上的の問題がある。そこで、1回の投与で骨吸収阻害活性薬物を長期にわたり持続して生体内に放出する製剤を開発し、骨粗鬆症治療の臨床に役立てることが望まれている。しかし、生体内分解型高分子重合物の徐放メカニズムは不明な点が多く、とくに低分子量ペプチドに関しては生体内分解性高分子重合物の分解と薬物の放出は一致しない場合が多い。さらに、骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチド（以下、骨吸収阻害オリゴペプチドと略記する場合もある。）の持続性製剤の製造に成功したという報告はない。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記した問題点を解決す

2

るため本願発明者らは鋭意研究の結果、使用する生体内分解性高分子重合物としては、生体内分解性脂肪族ポリエステルが適当であることを見いだした。そしてこれらの知見に基づき、さらに鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。本発明は、骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドまたはその塩を生体内分解性脂肪族ポリエステル中に含有させてなる徐放性マイクロカプセル（以下、本発明のマイクロカプセルと略記することもある。）を提供するものである。

【0006】本明細書において、アミノ酸およびペプチドなどを略号で表示する場合、アイユパックーアイユービー（IUPAC-IUB）コミッション・オン・バイオケミカル・ノメンクレイチャー（Commission on Biochemical Nomenclature）による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものである。また、特にことわらない限りアミノ酸はL体を示すものとする。これら略号は、それに相当する化合物のペプチド結合を形成し得る残基を示す場合もある。その例を下記に示す。

Gly : グリシン

20 Ala : アラニン

Val : バリン

Ile : イソロイシン

Leu : ロイシン

Met : メチオニン

Arg : アルギニン

Lys : リジン

His : ヒスチジン

Asp : アスパラギン酸

Glu : グルタミン酸

30 Ser : セリン

Thr : スレオニン

Phe : フェニルアラニン

Tyr : チロシン

Trp : トリプトファン

【0007】本発明に用いられる骨吸収阻害オリゴペプチドとしては、骨吸収阻害活性を有し、薬理学的に許容されるものであればいかなるものでも用いることができる。該オリゴペプチドは好ましくは、例えば骨吸収阻害を有し構成アミノ酸数が4から7のオリゴペプチドが挙げられる。さらに好ましくは、例えば骨吸収阻害活性を有し構成アミノ酸数が5から6のオリゴペプチドが挙げられる。具体的には、(L-/D-)Thr, (L-/D-)Arg, (L-/D-)Ser, (L-/D-)Alaおよび／または(L-/D-)Trpを構成アミノ酸とし、骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドが好ましい。さらに、(L-/D-)Arg-(L-/D-)Ser-(L-/D-)Ala-(L-/D-)Trpのアミノ酸配列またはその逆の配列を分子内に有し、骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチドが特に好ましい。上記骨吸収阻害オリゴペプチドの好ましい具体例としては、例えば Thr-Arg-Ser-Ala-Trp, Arg-Thr-Arg-Ser-Ala-Trp, Ala-Arg-Ser-Ala-Trp,

50

(D-Trp)-(D-Ala)-(D-Ser)-(D-Arg)-(D-Thr)等が挙げられる。

【0008】本発明に用いられる骨吸収阻害オリゴペプチドの薬理学的に許容される塩としてはナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土金属塩や、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸付加塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、蔞酸塩などの有機酸塩等が挙げられる。

【0009】本発明に用いられる骨吸収阻害オリゴペプチドは、ペプチド合成の常套手段で製造しうる。例えばペプチド合成の手段は、自体公知の方法に従えばよく、例えばエム・ボダンスキー (M. Bodansky) およびエム・オー・オンデッティ (M. A. Ondetti) 著、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis)、インターサイエンス、ニューヨーク、1966年；エフ・エム・フィン (F. M. Finn) およびケー・ホフマン (K. Hofmann) 著、ザ・プロテインズ (The Proteins)、第2巻、エイチ・ネンラス (H. Nenrath)、アール・エル・ヒル (R. L. Hill) 編集、アカデミックプレスインク、ニューヨーク、1976年；泉屋信夫他著「ペプチド合成の基礎と実験」丸善 (株) 1985年；矢島治明、榊原俊平他著、生化学実験講座1、日本生化学会編、東京化学同人1977年；木村俊他著、続生化学実験講座2、日本生化学会編、東京化学同人1987年；ジエイ・エム・ステewart (J. M. Stewart) およびジエイ・ディー・ヤング (J. D. Young) 著、ソリッド・フェイズ・ペプチド・シンセシス (Solid Phase Peptide Synthesis)、ピアスケミカルカンパニー、イリノイ、1984年などに記載された方法、例えばアジド法、クロライド法、酸無水物法、混酸無水物法、DCC法、活性エステル法、ウッドワード試薬Kを用いる方法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、DCC/HONB法、BOP試薬を用いる方法などが挙げられる。ペプチド合成は、液相合成法、固相合成法のいずれによってもよいが、液相合成法が好ましい場合もある。また、固相合成法による場合、自動ペプチド合成機 (例、自動ペプチド合成機430A；アプライドバイオシステム社) を用いることも有効である。

【0010】また本明細書で常用される保護基および試薬を下記の略号で表記する。

Boc : t-ブトキシカルボニル

Bzl : ベンジル

Tos : p-トルエンシルホニル

CHO : ホルミル

-P : ペプチド固相合成用ポリスチレン樹脂

PAM : p-オキシメチルスルフェニルアセトアミドメチル樹脂

BOP : ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシートリス (ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロ

フォスフェート

DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシミド

【0011】本発明に用いられる骨吸収阻害オリゴペプチドは、そのペプチド結合の任意の位置で切断される各種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシ基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料をペプチド合成の常套手段で縮合、また必要により該反応を適宜の順に繰り返すことにより製造される。さらに生成物が保護基を有する場合、その保護基を常套手段で脱離することにより製造しうる。原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などもまた公知のものあるいは手段から適宜選択しうる。

【0012】原料のアミノ基の保護基としては、例えばアラルキルオキシカルボニル基 (例、カルボベンゾキシ、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-クロルベンジルオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル等)、アルキルオキシカルボニル基 (例、t-ブチルオキシカルボニル、t-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル等)、アルカノイル基 (例、ホルミル、アセチル等)、ハロアルカノイル基 (例、トリフルオロアセチル等)、イミド基 (例、フタリル)、アリールスルフェニル基 (例、2-ニトロフェニルスルフェニル等)、アリールホスフィノチオイル基 (例、ジフェニルホスフィノチオイル等) などが挙げられる。

【0013】カルボキシ基の保護基としては、例えばエステル基 (例、アルキルエステル基 (例、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどのエステル基等)、アラルキルエステル基 (例、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル等)、フェナシルエステル基等)、ヒドラジド基 (例、カルボベンゾキシヒドラジド、t-ブチルオキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジド等) などが挙げられる。

【0014】セリンの水酸基は、例えばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエーテル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などがあげられる。またエーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。しかしながら、セリンの水酸基は必ずしも保護する必要はない。

【0015】チロシンのフェノール性水酸基の保護基と

5

しては、例えば、アラルキル基（例、ベンジル、2，6-ジクロロベンジル、2-ニトロベンジル等）、アラルキルオキシカルボニル基（例、2-ブロモベンジルオキシカルボニル等）、アルキル基（例、*t*-ブチル等）などが挙げられる。必ずしも保護する必要はない。メチオニンはスルホキサイドの形で保護しておいてもよい。

【0016】ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えばアリールスルホニル基（例、*p*-トルエンスルホニル、4-メトキシ-2，3，6-トリメチルベンゼンスルホニル等）、アリール基（例、2，4-ジニトロフェニル等）、アラルキルオキシメチル基（例、ベンジルオキシメチル等）、アルコキシメチル基（例、*t*-ブトキシメチル等）、アルキルオキシカルボニル基（例、*t*-ブトキシカルボニル等）、アラルキル基（例、トリチル等）、アラルキルオキシカルボニル基（例、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル等）などがあげられるが、必ずしも保護する必要はない。

【0017】トリプトファンのインドールの保護基としては、アルカノイル基（例、ホルミル、アセチル等）、アリールスルホニル基（例、2，4，6-トリメチルベンゼンスルホニル、2，4，6-トリメトキシベンゼンスルホニル等）、アルキルオキシカルボニル基（例、 β ， β ， β -トリクロルエチルオキシカルボニル等）、アリールホスフィノチオイル基（例、ジフェニルホスフィノチオイル等）などがあげられるが、必ずしも保護する必要はない。

【0018】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例、ペンタクロロフェノール、2，4，5-トリクロロフェノール、2，4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、*p*-ニトロフェノール、*N*-ハイドロキシ-5-ノルボルネン-2，3-ジカルボキシイミド、*N*-ハイドロキシスクシミド、*N*-ハイドロキシフタルイミド、*N*-ハイドロキシベンゾトリアゾール）とのエステル〕などがあげられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば対応するリン酸アミドがあげられる。縮合反応は反応を阻害しない溶媒の存在下に行うことができる。溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られているものから適宜選択されうる。例えば無水又は含水のアミド類（例、ジメチルホルムアミド、*N*-メチルピロリドン等）、スルホキシド類（例、ジメチルスルホキサイド等）、ピリジン類（例、ピリジン、 α ， β ， γ -ピコリン等）、ハロゲン化炭化水素類（例、ジクロロメタン、クロロホルム、1，2-ジクロロエタン等）、エーテル類（例、ジオキサン、テトラヒドロフラン）、ニトリル類（例、アセトニトリル）、エステル類（例、酢酸エチル等）あるいはこれらの適宜の混合物などがあげられる。縮合反応における、反応性カルボキシル基を有

6

する原料と反応性アミノ基を有する原料との使用量比は、反応性カルボキシル基を有する原料1重量部に対し反応性アミノ基を有する原料約0.5から10重量部、好ましくは約0.7から5重量部である。反応温度は、ペプチド結合形成反応に使用されうることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～30℃の範囲から適宜選択される。反応時間は、ペプチド結合形成反応に使用されうることが知られている範囲から適宜選択され、通常約数分から数十時間程度（例えば5分から30時間等）の範囲から適宜選択される。

【0019】保護基の脱離方法としては、例えばPd黒あるいはPd炭素等の触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、スルホン酸類（例、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸等）、ハロゲン化酢酸（例、トリフルオロ酢酸等）あるいはこれらの混合液等による酸処理や、また液体アンモニア中アルカリ金属（例、ナトリウム等）による還元等もあげられる。上記酸処理による脱離基反応は、一般に約-20℃～40℃の適温でおこなわれる。反応時間は、数分から数十時間（例えば5分から30時間）である。酸処理においては、アニソール類（例、アニソール、チオアニソール等）、フェノール類（例、フェノール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール等）、スルフィド類（例、ジメチルスルフィド）、チオール類（例、1，4-ブタンジチオール、1，2-エタンジチオール）のごときカチオン補足剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2，4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記のチオール類（例、1，2-エタンジチオール、1，4-ブタンジチオール等）等の存在下の酸処理による脱保護以外に、希アルカリ金属水酸化物（例、希水酸化ナトリウム、希水酸化カリウム等）、希アンモニア等によるアルカリ処理によっても除去される。このようにして製造された骨吸収阻害オリゴペプチドは反応終了後、ペプチドの分離手段、例えば、抽出、分配、再沈殿、再結晶、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどによって採取される。

【0020】本発明に用いられる骨吸収阻害オリゴペプチドは自体公知の方法により薬理的に許容される塩とすることができる。このような塩としては、例えばアルカリ金属塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土金属塩（例、カルシウム塩、マグネシウム塩等）や、酸付加塩〔例、無機酸（例、塩酸、硫酸、リン酸等）あるいは有機酸（例、酢酸、プロピオン酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、蔞酸等）などとの付加塩等〕などが挙げられる。

【0021】本発明に用いられる生体内分解性脂肪族ポリエステルとしては、分子内に酸性残基を有し、水に難溶または不溶で、生体適合性で生体内で分解される脂肪

族ポリエステルであれば、いかなるものでも用いることができる。これら生体内分解性脂肪族ポリエステルは、重量平均分子量が約3,000から30,000、好ましくは約5,000から20,000ものが用いられる。また、生体内分解性脂肪族ポリエステルの分散度（重量平均分子量と数平均分子量との比）は、約1.2から4.0が、特に約1.5から3.5が好ましい。なお、本明細書で用いられる重量平均分子量および分散度は、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）で測定した値を意味する。

【0022】上記生体内分解性脂肪族ポリエステルの好ましい具体例としては、例えば α -ヒドロキシ酸類（例、グリコール酸、乳酸、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸、2-ヒドロキシイソカプロン酸、2-ヒドロキシカプリル酸等）、 α -ヒドロキシ酸の環状二量体類（例、グリコリド、ラクチド等）、ヒドロキシジカルボン酸類（例、リンゴ酸等）、ヒドロキシトリカルボン酸類（例、クエン酸等）等の単独重合物、2種以上の共重合物、あるいはこれら単独重合物および/または共重合物の混合物が挙げられる。なお、重合の形式は、ランダム、ブロック、グラフトのいずれでもよい。また上記 α -ヒドロキシ酸類、 α -ヒドロキシ酸の環状二量体類、ヒドロキシジカルボン酸類、ヒドロキシトリカルボン酸類が分子内に光学活性中心を有する場合、D-、L-およびDL-体のいずれも用いることができる。該生体内分解性脂肪族ポリエステルのさらには好ましい具体例としては、例えば特開昭61-285215号公報に記載された、乳酸/グリコール酸からなるコポリマーないしホモポリマー、ヨーロッパ特許公開第481732号公報に記載された、乳酸のホモポリマーとグリコール酸/炭素数4から12の α -ヒドロキシ酸（例、2-ヒドロキシ酪酸、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸、2-ヒドロキシカプロン酸等）のコポリマーとの混合物等が挙げられる。

【0023】本発明の徐放性マイクロカプセルは、例えば以下のような吸収阻害活性を有するオリゴペプチドを水中乾燥法、相分離法あるいは噴霧乾燥法によりマイクロカプセル化する方法またはこれに準ずる方法によって製造される。

【0024】まず、水に骨吸収阻害オリゴペプチドまたはその塩を前記の濃度になる量を溶解し、これに必要であればタンパク質（例、ゼラチン等）、海藻類（例、寒天等）、多糖類（例、アルギン酸等）、合成高分子物質（例、ポリビニルアルコール等）あるいは塩基性アミノ酸（例、アルギニン、リジン等）などの薬物保持物質を加えて溶解もしくは懸濁し、内水相液とする。これらの内水相液中には、骨吸収阻害オリゴペプチドまたはその塩の安定性、溶解性を保つためのpH調整剤として、酢酸、シュウ酸、クエン酸等の有機酸、炭酸、リン酸、

塩酸等の無機酸、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属水酸化物、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸およびそれらの塩〔例、炭酸、酢酸、シュウ酸、クエン酸等の有機酸、炭酸、リン酸、塩酸等の無機酸などとの塩〕などを添加してもよい。また、さらに生理活性ペプチドの安定化剤として、タンパク質（例、アルブミン、ゼラチン等）、デンプン誘導体（例、デキストリン、プルラン等）、有機酸（例、クエン酸等）、エチレンジアミン四酢酸アルカリ金属塩（例、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム等）、亜硫酸水素アルカリ金属塩（例、亜硫酸水素ナトリウム等）、合成高分子物質（例、ポリエチレングリコール等）などを添加してもよい。あるいは保存剤として、一般に用いられるパラオキシ安息香酸エステル類（例、メチルパラベン、プロピルパラベン等）、ベンジルアルコール、クロロブタノール、チメロサルなどを添加してもよい。

【0025】このようにして得られた内水相液を、生体内分解性脂肪族ポリエステルを含む溶液（油相）に加え、ついで乳化操作を行い、W/O型乳化物をつくる。該乳化操作は、公知の分散法、例えば、断続振とう法、プロペラ型攪はん機あるいはタービン型攪はん機などのミキサーによる方法、コロイドミル法、ホモジナイザー法、超音波照射法などが用いられる。上記生体内分解性脂肪族ポリエステルを含む溶液（油相）は、生体内分解性脂肪族ポリエステルの有機溶媒中に溶解したものが用いられる。該溶媒としては、沸点が約120℃以下で、かつ水と混和しない性質のもので、生体内分解性脂肪族ポリエステルの溶解するものであればよく、例えばハロゲン化炭化水素（例、ジクロロメタン、クロロホルム、クロロエタン、ジクロロメタン、トリクロロエタン、四塩化炭素など）、脂肪酸エステル（例、酢酸エチル、酢酸ブチルなど）、エーテル類（例、エチルエーテル、イソプロピルエーテルなど）、芳香族炭化水素（例、ベンゼン、トルエン、キシレンなど）等が挙げられる。これらは2種以上適宜の割合で混合して用いてもよい。

【0026】ついで、このようにして調製されたW/O型エマルジョンをマイクロカプセル化工程に付するが、水中乾燥法によりマイクロカプセルを製する場合は、該W/Oエマルジョンをさらに第3相目の水相に加え、W/O/W型の3相エマルジョンを形成させた後、油相中の溶媒を蒸発させ、マイクロカプセルを調製する。上記外相の水相中に乳化剤を加えてもよく、その例としては、一般に安定なO/W型エマルジョンを形成するものであればいずれでもよいが、例えば、アニオン界面活性剤（例、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど）、非イオン性界面活性剤（例、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル〔ツイーン（Tween）80、ツイーン（Tween）60、アトラスパウダー社〕、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体〔HCO-60、HCO-50、日光ケミカルズ〕

など)、あるいは合成高分子物質(例、ポリビニールピロリドン、ポリビニールアルコール等)、半合成高分子物質(例、カルボキシメチルセルロース等)、リン脂質(例、レシチン等)、タンパク質(例、ゼラチン等)などが挙げられ、これらの中の1種類か、いくつかを組み合わせて使用してもよい。使用の際の濃度は、約0.01%から約20%(w/w)の範囲から適宜選択でき、より好ましくは約0.05%から約10%(w/w)の範囲で用いられる。

【0027】油相の溶媒の蒸発には、通常用いられる方法が採用される。該方法としては、プロペラ型攪はん機、あるいはマグネチックスターラーなどで攪はんしながら常圧もしくは徐々に減圧して行うか、ロータリーエバポレーターなどを用いて、真空度を調節しながら行う。このようにして得られたマイクロカプセルは遠心分離あるいは濾過して分取した後、マイクロカプセルの表面に付着している遊離の骨吸収阻害オリゴペプチド、薬物保持物質、乳化剤などを、蒸留水で数回繰り返し洗浄した後、再び、蒸留水などに分散して凍結乾燥する。必要であれば加温し、減圧下でマイクロカプセル中の水分および有機溶媒の脱離をより完全に行う。相分離法によりマイクロカプセルを製造する場合は、該W/Oエマルジョンに攪はん下、コアセルベーション剤を徐々に加え、生体内分解性ポリエステルを析出、固化させる。コアセルベーション剤としては、生体内分解性ポリエステルの溶剤に混和する高分子系、鉱物油系または、植物油系の化合物で、カプセル化用重合体を溶解しないものであればよく、例えば、シリコン油、植物油脂(例、ゴマ油、大豆油、コーン油、綿実油、ココナツ油、アマニ油等)、鉱物油、炭化水素類(例、n-ヘキサン、n-ヘプタン等)などが挙げられる。これらは2種維持用混合して用いてもよい。

【0028】このようにして得られたマイクロカプセルは、濾過して分取した後、ヘプタン等により繰り返し洗浄し、コアセルベーション剤を除去する。さらに、水中乾燥法と同様の方法で遊離薬物の除去、溶媒の脱離を行う。洗浄中の粒子同志の凝集を防ぐために、凝集防止剤〔例、マンニトール、ラクトール、ブドウ糖、デンプン類(例、コーンスターチ等)などの水溶性糖類、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、ゼラチン、フィブリン、コラーゲン等のタンパク質等〕を加えてもよい。噴霧乾燥法によりマイクロカプセルを製造する場合には、上記W/Oエマルジョンを、ノズルを用いてスプレードライヤー装置(噴霧乾燥器)の乾燥室内へ噴霧し、極めて短時間に微粒化液滴内の有機溶媒および水を揮発させ、微粒状のマイクロカプセルを調製する。ノズルとしては、二液体ノズル型、圧力ノズル型、回転ディスク型等がある。このとき、所望により、W/Oエマルジョンの噴霧と同時にマイクロカプセルの凝集防止を目的として、前述の凝集防止剤の水溶液を別ノズルより噴霧することも

有効である。このようにして得られたマイクロカプセルは、必要があれば加温し減圧下でマイクロカプセル中の水分の除去およびマイクロカプセル膜中の溶媒の除去をより完全に行う。

【0029】本発明のマイクロカプセルの粒子径は、徐放性の程度により、懸濁注射剤として使用する場合には、その分散性、通針性を満足させる範囲であればよく、例えば平均径として約1から約300 μ mの範囲が挙げられ、さらに約5から150 μ mの範囲にあることがより好ましい。本発明のマイクロカプセルは、生体内分解性ポリエステル性の性状の相違に基づく各種の徐放期間を有するマイクロカプセルを2種または2種以上適宜の割合で混合してもよい。本発明のマイクロカプセルは、そのままあるいは本発明のマイクロカプセルを原料物質として種々の剤形に製剤化し、筋肉内、皮下、血管、臓器、あるいは関節腔などへの注射剤または埋め込み剤、鼻腔、直腸、子宮などへの経粘膜剤、経口剤〔例、カプセル剤(例、硬カプセル剤、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等〕などとして投与することができる。本発明のマイクロカプセルは溶解し球状、棒状、針状、ペレット状、フィルム状等に賦形して徐放性製剤を製造することも出来る。該徐放性製剤は例えば特公昭50-1725号公報に記載の方法に従って製造される。さらに具体的には、薬物および高分子重合物を溶媒に溶かし、溶媒を適当な方法(例、噴霧乾燥、フラッシュ蒸発等)によって除去することにより該生体内分解型高分子組成物を製造できる。さらに該徐放性製剤を微細に粉碎して注射に適当な溶媒中に懸濁させて、注射用、経粘膜投与用あるいは経口投与用懸濁液を得ることもできる。

【0030】本発明のマイクロカプセルを注射剤とするには、本発明のマイクロカプセルを分散剤(例、Tween 80、HCO-60、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど)、保存剤(例、メチルパラベン、プロピルパラベンなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、ブドウ糖など)などと共に水性懸濁剤とするか、ゴマ油、コーン油などの植物油と共に分散して油性懸濁剤として実際に使用できる徐放性注射剤とする。さらに、上記のマイクロカプセルの徐放性注射剤は、懸濁剤として、上記の組成以外に、賦形剤(例えば、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、ブドウ糖など)を加えて、再分散した後、凍結乾燥もしくは噴霧乾燥して固型化し、使用時に、注射用蒸留水あるいは適当な分散媒を加えると、より安定した徐放性注射剤が得られる。本発明のマイクロカプセルを経口剤とするには、本発明のマイクロカプセルを、カプセル剤(硬カプセル剤、軟カプセル剤等)、顆粒剤、散剤等の固形製剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等の液剤等に自体公知の方法に従い製剤化することにより徐放性経口剤とする。本発明の徐放性製剤の投与量は、主薬で

11

ある骨吸収阻害オリゴペプチドの種類と含量、剤形、薬物放出の持続時間、投与対象動物〔例、温血哺乳動物（例、マウス、ラット、ウマ、ウシ、ヒト）〕などにより種々異なるが、該主薬の有効量であればよい。例えば、上記温血哺乳動物に1回あたり投与量として、マイクロカプセルの重量が好ましくは約0.1mgないし100mg/kg体重、より好ましくは約0.2mgないし50mg/kg体重の範囲から適宜選ぶことができる。投与回数は、数週間に一回、一カ月間に一回、あるいは一年間に一回等主薬である骨吸収阻害オリゴペプチドの種類と含量、剤形、薬物放出の持続時間、投与対象動物〔例、温血哺乳動物（例、マウス、ラット、ウマ、ウシ、ヒト）〕などにより適宜選ぶことができる。このようにして、通常の1回投与量より多い有効量の骨吸収阻害活性を有するオリゴペプチド、および生体内分解性ポリエステルよりなり、長期間にわたって該薬物を持続的に放出させることができる徐放性マイクロカプセルとして調製された医薬品組成物が得られる。

【0031】

【実施例】以下に参考例、実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明する。混合溶媒において示したパーセント(%)は容量/容量パーセントを表す。

【0032】参考例1 オステオースタチン(Thr-Arg-Ser-Ala-Trp)の合成

本ペプチドの合成は自動ペプチド合成機430A(アプライドバイオシステム社)を用いた固相合成法にて行った。プログラムは「OPT-HR」(アプライドバイオシステム社)を用い、Boc-アミノ酸をN-メチルピロリドン中で縮合する方法を採用した。基本的な合成過程等はメリーフィールド・アール・ビー(Merrifield, R. B.)(1969)アドバンス・オブ・エンザイモロジー(Adv. Enzymol.)32, 221-296の方法に順じている。レジンにはBoc-Trp(CHO)-PAM-P(0.5mmol/g)を用い、カルボキシル末端から順次合成した。Boc-アミノ酸として、Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH およびBoc-Thr(Bzl)OHを用いた。アミノ末端まで合成したのちペプチドレジン合成機から取り出し、乾燥した。ペプチドレジン1gに1.5mlのp-クレゾールおよび0.5mlの1,2-エタンジチオールを加え、さらに約8mlの液体フッ化水素を加えて、0℃で2時間反応させた。反応終了後、デシケーター中でフッ化水素を減圧除去し、0.1%の2-メルカプトエタノールを含むジエチルエーテルで、続いてジエチルエーテルで洗い、大部分の混在試薬を除去した。ペプチドを10mlの3%酢酸で抽出し、ろ過により抽出液中に混入しているレジンを除いた。ろ液をセファデックス(Sephadex)G-25を用いるゲルろ過により精製した。ゲルろ過条件は、カラムサイズ、2.8×60cm; 検出波長、230nm; 溶媒、3%酢酸; 流速、40ml/hrであった。ペプチドを含むフラクションを集めて凍結乾燥し、

12

得られた粉末標品について逆相高速液体クロマトグラフィーによりさらに精製した。カラム、YMC-バック、D-ODS-5 20×300mm(山村化学研究所社製); カラム温度、25℃; 溶出溶媒A, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9% 蒸留水; 溶出溶媒B, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9% アセトニトリル; 溶出プログラム, 0分(90%A+10%B), 40分(50%A+50%B); 溶出速度8ml/min, 検出波長230nm。本条件下で保持時間23分に溶出された主ピーク画分を集めてバイオラッドAG1×8(CH₃COOH型, 1.8×5cm)のカラムに通し、洗液を集め、アセトニトリルを留去した後、凍結乾燥した。白色粉末114mgを得た。得られたペプチドは、上記と同様の条件における高速液体クロマトグラフィーによる分析で、保持時間23分に鋭い単一ピークを与えた。

アミノ酸分析(4%チオグリコール酸存在下、脱気封管中6規定塩酸, 110℃24時間加水分解): Ser 0.87(1), Ala 1.04(1), Arg 1.00(1), Trp 0.88(1), Thr 0.94(1)。回収率76%。

【0033】参考例2 Arg-Thr-Arg-Ser-Ala-Trpの合成

参考例1の化合物と同様にして合成した。保護ペプチドレジン1.23gをフッ化水素処理した後精製し、142mgの目的ペプチドを得た。このものは下記の条件での高速液体クロマトグラフィーで保護時間22.4分に鋭い単一ピークとして溶出された。カラムYMC-バックD-ODS-5, 20×300mm; カラム温度, 25℃; 溶出溶媒A, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%蒸留水; 溶出溶媒B, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%アセトニトリル; 溶出速度5ml/分, 検出波長280nm。溶出プログラム, 0分(80%A+20%B), 30分(75%A+25%B);

アミノ酸分析(4%チオグリコール酸存在下、脱気封管中6規定塩酸, 110℃24時間加水分解): Ser 0.85(1), Arg 2(2), Trp 0.92(1), Trp 0.85(1), Ala 1.04(1)。

【0034】参考例3

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4頸フラスコに90%D, L-乳酸水溶液300gと90%L-乳酸100gを仕込み、窒素気流下100℃、500mmHgから150℃、30mmHgまで4時間かけて減圧加熱を行なって留出水を除去した。さらに5~7mmHg、150~180℃で24時間減圧加熱を行なった後冷却し、琥珀色の乳酸重合体を得た。得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合体を集め、30℃で真空乾燥した。得られた乳酸重合体は、GPCによる重量平均分子量は9000であった。

【0035】参考例4

窒素導入管および冷却管を備えた1000mlの4頸フラ

13

スコにグリコール228、2gと2-ヒドロキシ酪酸208、1gを仕込み、窒素気流下90℃、400mmHgから150℃、30mmHgまで5時間かけて減圧加熱を行なって留出水を除去した。さらに5~7mmHg、150~175℃で72時間減圧加熱を行なった後冷却し、琥珀色の乳酸重合体を得た。得られた重合体を1000mlのジクロロメタンに溶解し、60℃の温水中に攪拌下注入した。分離してくる餅状の高分子重合物を集め、30℃で真空乾燥した。得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体は、GPCによる重量平均分子量は16000であった。

【0036】実施例1

参考例1で得られたオステオスタチン(Thr-Arg-Ser-Ala-Trp)40mgを蒸留水0.05mlに溶解し、実施例1で得られたポリ乳酸1gおよび参考例3で得られたグリコール酸・2-ヒドロキシ酪酸共重合体1gをジクロロメタン2.5mlに溶解した液に加え、小型ホモジナイザーで60秒間混合し、W/O型エマルジョンを得た。こ*

薬物残存率(%)^{a)}

	1日	1週	2週	3週	4週
実施例2	61.1	31.2	23.1	20.2	2.1

a) pH7.0, 1/30Mリン酸緩衝液, 37℃

【0038】

【発明の効果】本発明の徐放性マイクロカプセルは、骨※

14

*のエマルジョンを18℃に冷却した後、あらかじめ19℃に調整しておいた0.1%ポリビニールアルコール(PVA)水溶液500mlに注入しタービン型ホモミキサーを使用してW/O/W型エマルジョンとした。この後、W/O/W型エマルジョンを室温で攪拌しつつジクロロメタンを揮散させて内部のW/O型エマルジョンを固化させ遠心分離機を用いて捕集した。これを再び蒸留水に分散しさらに遠心分離を行なって遊離薬物等を洗浄した。捕集されたマイクロカプセルはD-マニトール0.15gを加え、凍結乾燥によって粉末として得られた。

【0037】実施例2

参考例2で得られたヘキサペプチド(Arg-Thr-Arg-Ser-Ala-Trp)40mgを用いて実施例1と同様にしてマイクロカプセルを調製した。得られたマイクロカプセルの37℃, pH7.0のリン酸緩衝液中で行なった in vitro 溶出試験の結果を〔表1〕に示す。

【表1】

※吸収阻害オリゴペプチドを長期にわたって放出し、骨粗鬆症治療に有効に用いることができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

A61K 47/34

識別記号

庁内整理番号

G 7433-4C

F I

技術表示箇所